

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

014129577     \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 2001-613787/200171

Dispersion aid for fine particle for diagnostic test, diagnostic test  
reagent, its preparation method, test method and use

Patent Assignee: NIPPON OILS & FATS CO LTD (NIOF )

Number of Countries: 001    Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
↓ JP 2001228149	A	20010824	JP 200034931	A	20000214	200171 B

Priority Applications (No Type Date): JP 200034931 A 20000214

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2001228149	A		12 G01N-033/531	

Abstract (Basic): JP 2001228149 A

NOVELTY - Dispersion aid for fine particle for diagnostic test,  
comprises phosphoryl choline type polymer obtained by polymerization of  
a monomer (I).

DETAILED DESCRIPTION - The polymer is one obtained by  
polymerization of a monomer shown by the formula (I)

X=divalent organic group;

Y=alkylene or oxy;

Z=H or R<sup>5</sup>-O-(C=O);

R<sup>5</sup>=1-10C alkyl or 1-10C hydroxyalkyl;

R<sup>1</sup>=H or methyl;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup>=H, 1-6C alkyl or 1-6C hydroxyalkyl;

m=0 or 1; and

n=1 to 4.

Test reagent comprising fine particle and the dispersion aid,  
method for test using the reagent composition are also claimed.

ACTIVITY - None given.

MECHANISM OF ACTION - None given.

USE - Useful for dispersing fine particle for diagnostic test  
reagent.

pp; 12 DwgNo 0/0

Derwent Class: A96; B04; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/531

International Patent Class (Additional): G01N-033/543

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-228149  
(P2001-228149A)

(43) 公開日 平成13年8月24日 (2001.8.24)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	データベース* (参考)
G 0 1 N 33/531		G 0 1 N 33/531	B
33/543	5 3 1	33/543	5 3 1

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2000-34931 (P2000-34931)

(22) 出願日 平成12年2月14日 (2000.2.14)

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社  
東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72) 発明者 首藤 健志郎

茨城県つくば市花畑3-7-1

(72) 発明者 榎 秀次郎

茨城県つくば市梅園2-15-5

(72) 発明者 山田 智

茨城県つくば市梅園2-24-5

(72) 発明者 坂元 伸行

茨城県つくば市梅園2-16-1

(72) 発明者 鈴木 憲

茨城県つくば市吾妻1-4-3

(54) 【発明の名称】 臨床検査用微粒子分散剤、検査用試薬、試薬の製造方法、検査方法および用途

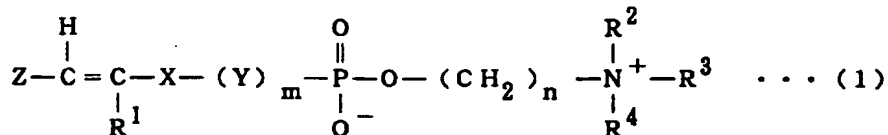
(57) 【要約】

【課題】微粒子含有試薬の分散安定性を向上させ、また試薬調整の過程あるいは測定過程で凝集させた臨床検査用微粒子に対して、結合させている抗体や抗原等の活性を落とすことなく再分散性を向上させ再現性が高く高感度で自動分析機に適した簡単な方法で処理できる臨床検査用微粒子分散剤を提供する。

【解決手段】ホスホリルコリン類似基含有単量体を含む単量体組成物を重合してなる重合体を有効成分とする臨床検査用微粒子分散剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の式(1)

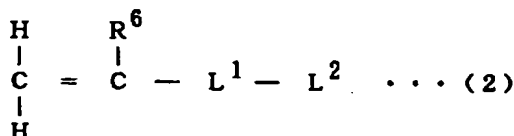


ただし、式中、Xは2価の有機残基を示し、Yは炭素数1～6のアルキレンオキシ基を示し、Zは水素原子もしくは $\text{R}^5-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$ (ただし、 $\text{R}^5$ は炭素数1～10のアルキル基または炭素数1～10のヒドロキシアルキル基を示す)を示す。また、 $\text{R}^1$ は水素原子もしくはメチル基を示し、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1～6のアルキル基またはヒドロキシアルキル基を示す。 $m$ は0または1を示す。 $n$ は1～4の整数である。}で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体を含む単量体組成物を重合してなる重合体を有効成分とする臨床検査用微粒子分散剤。

【請求項2】ホスホリルコリン類似基含有単量体を含む単量体組成物が、A成分のホスホリルコリン類似基含有単量体20～98mol%と、B成分の疎水性単量体2～80mol%とからなる単量体組成物である請求項1記載の臨床検査用微粒子分散剤。

【請求項3】A成分のホスホリルコリン類似基含有単量体が、2-(メタ)アクリロイルオキシエチル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェートであり、B成分の疎水性単量体が下記の式(2)

## 【化2】



ただし、式中、 $\text{L}^1$ は、 $-\text{C}_6\text{H}_4-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_{10}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$ および $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ からなる群より選ばれる基を示し、 $\text{L}^2$ は、水素原子、 $-(\text{CH}_2)_g-\text{L}^3$ 、 $((\text{CH}_2)_p-\text{O})_h-\text{L}^3$ から選ばれる疎水性官能基を示す。 $(g, h)$ は1～24、 $p$ は3～5の整数を示し、 $\text{L}^3$ は、水素原子、メチル基、 $-\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$ から選ばれる官能基を示す。) }で表される疎水性単量体である請求項1または2記載の臨床検査用微粒子分散剤。

【請求項4】請求項1～3のいずれか1項に記載の臨床検査用微粒子分散剤と、生体関連物質に生化学的に特異的に結合する部位とを担持させてなる検査用微粒子を含有することを特徴とする微粒子含有臨床検査試薬。

【請求項5】検査用微粒子が、微粒子ラテックスまたは磁性微粒子である請求項4に記載の微粒子含有臨床検査

## 【化1】

試薬。

【請求項6】臨床検査用の水中分散微粒子と、前記の請求項1～3のいずれか1項に記載の臨床検査用微粒子分散剤の分散溶液とを接触させて、微粒子に前記の式

(1)で表される単量体に基づく構成成分を含有する重合体と、生体関連物質に生化学的に特異的に結合する部位とを担持させてなることを特徴とする臨床検査試薬の製造方法。

【請求項7】請求項1～3のいずれか1項に記載の臨床検査用微粒子分散剤と生体関連物質に生化学的に特異的に結合する部位とを担持させた微粒子と、前記の生体関連物質とを接触させて複合体を形成させ、分離し、さらにその複合体から、前記の生体関連物質を分離して精製する方法。

【0009】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、臨床検査の分野において微粒子を使用する際の分散剤、それを用いた検査試薬、検査方法、試薬の製造方法、生体関連物質の分離精製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】臨床検査の分野では、高感度に抗原量を測定する検査方法としてポリスチレン等のラテックスの凝集反応による検査が行われている。ラテックス表面に抗原(または抗体)を物理的あるいは化学的に担持(感作)させ、検出対象である前記の抗原に対する抗体(または前記の抗体に対する抗原)との免疫反応によりラテックスが凝集する際に変化する濁度、粒径分布等を検出し、被測定物質量を評価する方法である。

【0003】このようなラテックス試薬は、年々自動化及び高感度化が進められている。自動化を行うためには、自動分析機内でラテックス試薬が経時的に凝集したり、ラインやセルに吸着することのないように分散安定化させる必要がある。高感度化を行うためには、検体が入る前はラテックスの分散性が高く、検体導入後の免疫反応による凝集は速やかに起こる必要があり、免疫反応を阻害せずに分散安定化させることがやはり必要となる。

【0004】また、ラテックス試薬を調製する際には、ラテックスに抗原(または抗体)を結合させた後に遠心沈殿処理を行い、ラテックスを一度凝集させ未担持(未感作)の抗原(または抗体)や不純物を上澄みと一緒に

取り除く操作を行う。この精製処理の際に、ラテックスが凝集し完全に再分散することができないことがあり、測定の実現性や感度が低下することになる。

【0005】このような場合には、ラテックスを調製する際に使用する界面活性剤や重合可能な親水性単量体を利用することで表面の電荷を制御し再分散性を上げる方法が一般的に行われる。しかしながら、このような表面電荷を制御する方法では、結合させるべき抗原（または抗体）を結合させることが困難となったり、免疫反応による凝集を阻害することがあるため、結合させる抗原（または抗体）の種類に応じて複雑で煩雑な調整が必要となる。

【0006】その他に臨床検査の分野では、磁性微粒子を使用する検査方法がある。この方法では通常、表面に抗体を結合させた磁性微粒子を使用して、以下の方法に準じて検査を行う。

(1) 抗体（または抗原）を担持させた磁性微粒子（磁性微粒子-抗体、とする）の入った反応容器に抗原（被検出物質となる（または抗体）の入った検体を導入し免疫反応を起こさせる（磁性微粒子-抗体-抗原、とする）。

(2) 磁力により前記の磁性微粒子を凝集させ、検体液を分離した後、磁力を落として分散状態とする。

(3) 抗原と結合する酵素標識抗体液（酵素標識抗体）を容器に導入し、免疫反応を起こさせ、磁性微粒子-抗体-抗原-酵素標識抗体の複合体を形成させる。

(4) 磁力により磁性微粒子を凝集させ、酵素標識抗体液と分離させ未反応の酵素標識抗体を取り除いた後、磁力を落として分散状態とする。

(5) 酵素標識抗体の基質液を導入し、酵素反応により生じた物質の量を測定することにより、抗原量を評価する。

【0007】このような手順で行われる検査において、凝集させた磁性微粒子の再分散性が劣ると免疫反応の効率に悪影響をおよぼす。通常は、界面活性剤等を使用して磁性微粒子の再分散性を向上させる方法が行われるが、磁性微粒子に結合している抗体を変性させ活性を落したり、残留した界面活性剤が抗原との免疫反応を阻害することがあるため、結合させる抗体や検体の種類に応じて複雑で煩雑な調整が必要となる。

【0008】臨床検査の分野においては、磁性微粒子を使用するのは単に検査をする場合だけではなく、磁性微粒子表面に結合させた抗体と免疫反応する抗原を分離精製する目的にも使用される。この場合には、例えば、磁性微粒子-抗体-抗原の複合体を磁力で凝集させ不純物を液とともに取り除いた後、再分散させpHの変化等により抗原を遊離回収させる方法が行われる。この時、磁性微粒子-抗体-抗原の複合体の再分散性が低いと抗原の回収率が低下するし、再分散性を向上させるために界面活性剤を添加すると抗体や抗原の変性が起こる恐れが

ある。

【0009】同様な操作により、細胞、細菌、DNA、酵素等についても、それぞれに対して特異的結合部位を担持する磁性微粒子を用いた分離精製が行われている。しかし、このような分離精製の場合には、上記と同様な理由から高い再分散性を有する磁性微粒子が望まれている。

【0010】一方、ホスホリルコリン基含有重合体は、生体膜に由来するリン脂質類似構造に起因して、血液適合性、補体非活性化、生体物質非吸着性等の生体適合性に優れ、また防汚性、保湿性等の優れた性質を有することが知られており、それぞれの機能を生かした生体関連材料の開発を目的とした重合体の合成およびその用途に関する研究開発が活発に行われている。

【0011】その中でも特開平7-5177号公報、特開平7-83923号公報、特開平10-114800号公報には、ホスホリルコリン基含有重合体が容器等へのタンパク質の吸着を抑制することができることを利用して、高精度の臨床検査が行える技術が開示されている。

【0012】特に特開平10-114800号公報には、ラテックス状、微粒子状の固相に対してもタンパク質の非特異的吸着を抑制することが開示されている。しかしながら、このような臨床検査用微粒子に対して免疫反応を阻害せずに臨床検査用微粒子の分散性を向上させる効果があることについては知られていない。

【0013】また、特開平10-109029号公報には、ホスホリルコリン基含有重合体を利用して水に溶解あるいは分散させるのが困難なものを可溶化できる技術が開示されている。しかしながら、微粒子を利用する臨床検査の分野において、ホスホリルコリン基含有重合体を利用して、免疫反応を阻害せずに臨床検査用微粒子を分散させる効果及び凝集した臨床検査用微粒子を再分散させる効果については知られていない。

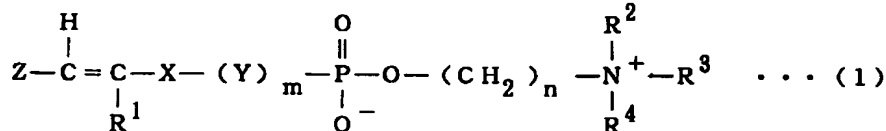
【0014】

【発明が解決しようとする課題】本発明の第1の目的は、臨床検査試薬を調整する過程及び検査に使用する過程において凝集させた臨床検査用微粒子に対し、結合させている抗体や抗原等の活性を低下させることなく分散性を向上させ、さらに凝集状態からの再分散性を向上させる分散剤を提供することにある。また、本発明の第2の目的は、前記の分散剤を用いて担持させた、臨床検査用微粒子を使用する再現性が高く高感度で自動分析機に適した検査試薬を提供することにある。また、本発明の第3の目的は、前記の分散剤を用いて担持させた、臨床検査用微粒子を使用する検査試薬の製造方法を提供することにある。また、本発明の第4の目的は、前記の分散剤を用いて担持させた、臨床検査用微粒子を使用する臨床検査方法を提供することにある。またさらに、本発明の第5の目的は、前記の分散剤を用いて担持させた、臨

床検査用微粒子を使用する生体関連物質の回収率を向上させる分離精製方法を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記の問題点に鑑み、鋭意検討した結果、特定のホスホリルコリン類似基含有単量体を含む単量体組成物を重合して得られる重合体を、臨床検査用微粒子に処理すると、前記の



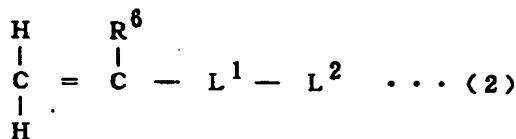
【0018】ただし、式中、Xは2価の有機残基を示し、Yは炭素数1～6のアルキレンオキシ基を示し、Zは水素原子もしくは $\text{R}^5-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$ （ただし、 $\text{R}^5$ は炭素数1～10のアルキル基または炭素数1～10のヒドロキシアルキル基を示す）を示す。また、 $\text{R}^1$ は水素原子もしくはメチル基を示し、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1～6のアルキル基またはヒドロキシアルキル基を示す。 $m$ は0または1を示す。 $n$ は1～4の整数である。}で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体を含む単量体組成物を重合してなる重合体を有効成分とする臨床検査用微粒子分散剤。

【0019】〔2〕ホスホリルコリン類似基含有単量体を含む単量体組成物が、A成分のホスホリルコリン類似基含有単量体（A）20～98molo%とB成分の疎水性単量体（B）2～80molo%とからなる単量体組成物である前記〔1〕の臨床検査用微粒子分散剤。

【0020】〔3〕A成分のホスホリルコリン類似基含有単量体が、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリメチルアンモニオ）エチルホスフェートであり、B成分の疎水性単量体下記式（2）

【0021】

〔化4〕



【0022】ただし、式中、 $\text{L}^1$ は、 $-\text{C}_6\text{H}_4-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_{10}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{oよび}-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ からなる群より選ばれる基を示し、 $\text{L}^2$ は、水素原子、 $-(\text{CH}_2)_g-\text{L}^3$ 、 $((\text{CH}_2)_p-\text{O})_h-\text{L}^3$ から選ばれる疎水性官能基を示す。（ $g$ 、 $h$ は1～24、 $p$ は3～5の整数を示し、 $\text{L}^3$ は、水素原子、メチル基、 $-\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$ から選ばれる官能基を示す。）で表される疎水性単量体である前記〔1〕または〔2〕の臨床検査用微粒子分散剤。

問題点を解決することの知見を得て、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、以下の〔1〕～〔7〕のとおりである。

【0016】〔1〕 下記の式（1）

【0017】

〔化3〕

【0023】〔4〕 検査用微粒子に、前記の臨床検査用微粒子分散剤と、生体関連物質に生化学的に特異的に結合する部位とを担持させてなる微粒子を含有することを特徴とする微粒子含有臨床検査試薬。

【0024】〔5〕 検査用微粒子が、微粒子ラテックスまたは磁性微粒子である前記〔4〕の微粒子含有臨床検査試薬。

【0025】〔6〕 臨床検査用の水中分散微粒子と、前記の臨床検査用微粒子分散剤の分散溶液とを接触させて、微粒子に前記式（1）で表される単量体に基づく構成成分を含有する重合体、及び生体関連物質に生化学的に特異的に結合する部位を担持させてなることを特徴とする臨床検査試薬の製造方法。

【0026】〔7〕 前記の臨床検査用微粒子分散剤と、生体関連物質に生化学的に特異的に結合する部位とを担持させた微粒子と、前記の生体関連物質とを接触させて複合体を形成させ、分離し、さらにその複合体から、前記の生体関連物質を分離して精製する方法。

【0027】

【発明の実施の形態】本発明の臨床検査用微粒子分散剤は、特定のホスホリルコリン類似基含有単量体（以下、PC単量体と略す）を含む単量体組成物を重合してなる重合体（以下PC重合体と略す）を主成分とするものである。PC単量体を含む単量体組成物は、PC単量体のみでもよいし、その他に重合可能な他の重合性単量体を含んでいてもよい。具体的には、さらに、前記のPC重合体は、A成分としてPC単量体20～98molo%とB成分として疎水性単量体2～80molo%とからなる単量体組成物を重合してなる重合体を好ましく挙げることができる。より好ましくは、A成分としてPC単量体40～80molo%とB成分として疎水性単量体20～60molo%とからなる単量体組成物である。

【0028】B成分の疎水性単量体が2molo%未満では十分に微粒子の表面の疎水性成分に対する親和性を持たせることができず、80molo%より多いとホスホリルコリン類似基（PC基と略す）の効果を発揮させるのが困難であるので好ましくない。

【0029】またさらに、前記のPC重合体は、A成分

としてPC単量体20~88mol%と、B成分として疎水性単量体2~40mol%およびC成分として親水性単量体10~70mol%の単量体組成物を重合してなる重合体を好ましく挙げることができる。より好ましくは、A成分としてPC単量体40~70mol%と、B成分として疎水性単量体5~30mol%およびC成分として親水性単量体20~50mol%の単量体組成物である。

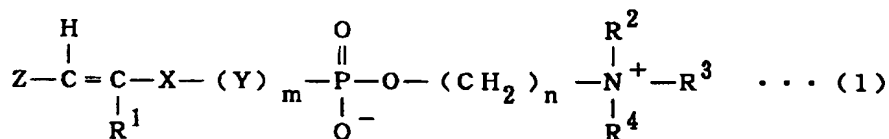
【0030】A成分のPC単量体が20mol%未満では、PC基の効果を発揮させるのが困難であるので好ましくなく、B成分の疎水性単量体が2mol%未満、C成分の親水性単量体10mol%未満では、微粒子表面

の親水性成分に対する親和性を持たせることができず好ましくない。A成分のPC単量体が88mol%より多くなると、微粒子への親和性が小さくなるので好ましくなく、B成分の疎水性単量体が40mol%より多いと親水性の付与が少なくなり、C成分の親水性単量体70mol%より多いと非特異吸着が増加するので好ましくない。

【0031】ここで、前記のPC単量体は、下記の式(1)

【0032】

【化5】



【0033】ただし、式中、Xは2価の有機残基を示し、Yは炭素数1~6のアルキレンオキシ基を示し、Zは水素原子もしくは $\text{R}^5-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$ （ただし、 $\text{R}^5$ は炭素数1~10のアルキル基または炭素数1~10のヒドロキシアルキル基を示す）を示す。また、 $\text{R}^1$ は水素原子もしくはメチル基を示し、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1~6のアルキル基またはヒドロキシアルキル基を示す。 $m$ は0または1を示す。 $n$ は1~4の整数。}で表される。

【0034】式(1)中のXの2価の有機残基としては、例えば、 $-\text{C}_6\text{H}_4-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_{10}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 等が挙げられる。

【0035】式(1)中のYは、炭素数1~6のアルキレンオキシ基であり、例えば、メチルオキシ、エチルオキシ、プロピルオキシ、ブチルオキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ等の基が挙げられる。

【0036】式(1)中のZは、水素原子もしくは $\text{R}^5-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-$ 基を示す。ただし、 $\text{R}^5$ は炭素数1~10のアルキル基または炭素数1~10のヒドロキシアルキル基を示す。ここで、炭素数1~10のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基等が挙げられる。

【0037】また、炭素数1~10のヒドロキシアルキル基としては、例えば、ヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基、2-ヒドロキシプロピル基、4-ヒドロキシブチル基、2-ヒドロキシブチル基、5-ヒドロキシペンチル基、2-ヒドロキシペンチル基、6-ヒドロキシヘキシル基、2-ヒ

ドロキシヘキシル基、7-ヒドロキシヘプチル基、2-ヒドロキシヘプチル基、8-ヒドロキシオクチル基、2-ヒドロキシオクチル基、9-ヒドロキシノニル基、2-ヒドロキシノニル基、10-ヒドロキシデシル基、2-ヒドロキシデシル基等が挙げられる。

【0038】PC単量体としては、具体的には例えば、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、3-((メタ)アクリロイルオキシ)プロピル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、4-((メタ)アクリロイルオキシ)ブチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、5-((メタ)アクリロイルオキシ)ペンチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、6-((メタ)アクリロイルオキシ)ヘキシル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリエチルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリプロピルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリブチルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリシクロヘキシルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリフェニルアンモニオ)エチルホスフェート、

【0039】2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリメタノールアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)プロピル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ブチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ペンチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート、2-((メ

タ) アクリロイルオキシ) ヘキシル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、

【0040】 2- (ビニルオキシ) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、2- (アリロキシ) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、2- (p-ビニルベンジルオキシ) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、2- (p-ビニルベンゾイルオキシ) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、2- (スチリルオキシ) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、2- (p-ビニルベンジル) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、2- (ビニルオキシカルボニル) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、2- (アリロキシカルボニル) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、

【0041】 2- (アクリロイルアミノ) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、2- (ビニルカルボニルアミノ) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート、

【0042】 エチル- (2' - トリメチルアンモニオエチルホスホリルエチル) フマレート、ブチル- (2' - トリメチルアンモニオエチルホスホリルエチル) フマレート、ヒドロキシエチル- (2' - トリメチルアンモニオエチルホスホリルエチル) フマレート、エチル- (2' - トリメチルアンモニオエチルホスホリルエチル) マレート、ブチル- (2' - トリメチルアンモニオエチルホスホリルエチル) マレート、ヒドロキシエチル- (2' - トリメチルアンモニオエチルホスホリルエチル) マレート等を挙げることができる。

【0043】 この中でも2- (メタ) アクリロイルオキシ) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェートが好ましく、さらに2- (メタクリロイルオキシ) エチル-2' - (トリメチルアンモニオ) エチルホスフェート (=2- (メタクリロイルオキシ) エチルホスホリルコリンともいう、以下、MPCと略す) が入手性等の点でより好ましい。

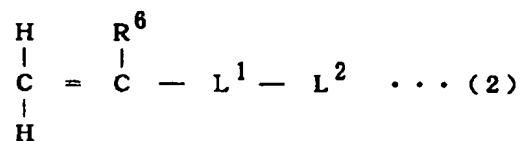
【0044】 PC単量体を重合する際には、前記のPC単量体の1種を単独で、もしくは2種以上を混合物として用いることができる。

【0045】 PC単量体は、公知の方法で製造できる。例えば、特開昭54-63025号公報、特開昭58-154591号公報等に示された公知の方法等に準じて製造することができる。

【0046】 PC単量体と共重合するB成分の疎水性単量体は、式(2)

【0047】

【化6】



【0048】 (ただし、式中、 $\text{L}^1$ は、 $-\text{C}_6\text{H}_4-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_{10}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$  および  $-\text{O}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$  からなる群より選ばれる基を示し、 $\text{L}^2$ は、水素原子、 $-(\text{CH}_2)_g-\text{L}^3$ 、 $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{L}^3$  から選ばれる疎水性官能基を示す。(g、hは1~24、pは3~5の整数を示し、ここで、 $\text{L}^3$ は、水素原子、メチル基、 $-\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$  から選ばれる官能基を示す。) で表される。

【0049】 B成分の疎水性単量体としては、具体的には例えば、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート、2-エチルヘキシル(メタ)アクリレート、ラウリル(メタ)アクリレート、ステアリル(メタ)アクリレート等の直鎖または分岐アルキル(メタ)アクリレート；シクロヘキシル(メタ)アクリレート等の環状アルキル(メタ)アクリレート；ベンジル(メタ)アクリレート、フェノキシエチル(メタ)アクリレート等の芳香族(メタ)アクリレート；ポリプロピレングリコール(メタ)アクリレート等の疎水性ポリアルキレングリコール(メタ)アクリレート；スチレン、メチルスチレン、クロロメチルスチレン等のスチレン系単量体；メチルビニルエーテル、ブチルビニルエーテル等のビニルエーテル系単量体；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル系単量体等が挙げられる。これらの1種または2種以上が用いられる。

【0050】 C成分の親水性単量体は、例えば、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ホスホン酸基、スルホン酸基、アミド基、アミノ基、ジアルキルアミノ基、トリアルキルアミノ塩基、トリアルキルホスホニウム塩基およびポリオキシエチレン基からなる群より選ばれる親水性基を有する単量体である。さらに、具体的には例えば、2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、2-ヒドロキシブチル(メタ)アクリレート、4-ヒドロキシブチル(メタ)アクリレート等の水酸基含有(メタ)アクリレート；アクリル酸、メタクリル酸(MAc)等のカルボン酸；スチレンスルホン酸、(メタ)アクリロイルオキシホスホン酸、2-ヒドロキシ-3-(メタ)アクリロキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライド等のイオン性基含有単量体；(メタ)アクリルアミド、アミノエチルメタクリレート、ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート等の含窒素単量体；ポリエチレングリコール(メタ)アクリレート等が挙げられる。これらの1種または2種以上が用いられる。

【0051】 PC重合体は、前記A成分のPC単量体と

B成分の疎水性単量体との単量体組成物、あるいは、前記A成分のPC単量体とB成分の疎水性単量体およびC成分の親水性単量体との単量体組成物を重合したものであればよく、通常のラジカル共重合により製造することができる。

【0052】本発明のPC重合体の分子量は、重量平均で、5,000~5,000,000の範囲がよく、さらに望ましくは100,000~2,000,000の範囲である。重合体の重量分子量が5,000未満では十分に微粒子再分散性を発揮させるのが困難であり、重合体の重量分子量が5,000,000より大きいとPC重合体の水性溶液の粘性が高くなりすぎ微粒子の免疫反応を阻害するおそれがあるため好ましくない。

【0053】本発明における臨床検査用微粒子とは、おおよそ10nm~100 $\mu$ mの直径の水分散性の微粒子を指し、ラテックス、リボソーム、磁性微粒子、磁性細菌、赤血球等の臨床検査に使用することのできる微粒子であればいずれでもよい。

【0054】本発明の微粒子再分散剤が適用できるラテックスを使用した臨床検査方法としては、いずれの方法でもよいが、ラテックス凝集反応による濁度、光散乱、粒度分布等の変化を検出する方法等が挙げられる。

【0055】ラテックスとしては、乳化重合で製造されたポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等の微粒子が一般的であるが、どのような素材、方法で製造されたものでもよい。

【0056】本発明の微粒子再分散剤が適用できる磁性微粒子としては、前記従来技術で説明したような検査方法や分離精製方法で使用される磁性微粒子が一般的であるが、試薬調製、検査、分離精製の過程で一旦磁力で凝集させた後再分散させる磁性微粒子には、いずれの場合にも好適に使用できる。

【0057】磁性微粒子の構造としては、フェライト磁石、サマリウム-コバルト磁石、希土磁石、鉄、マンガ、コバルト、四三酸化鉄、三二酸化鉄、フェライト型ステンレス、マルテンサイト型ステンレス、アモルファス合金、シリコン鉄難磁性結晶、ニッケル、クロム等のように磁性を有する金属あるいは金属化合物の微粒子であり、必要に応じてポリマーや親油化剤で被覆したりあるいは含有させているものでもよい。

【0058】前記の検査用微粒子のなかでも、微粒子ラテックスまたは磁性微粒子がより好ましく挙げられる。

【0059】本発明の微粒子再分散剤が適用できる微粒子に結合させ得る生体関連物質と生化学的な特異的な結合部位を有する化合物としては、前記の特異的な結合部位を有していれば、いずれのものでもよいが、例えば、抗原、抗体等の免疫反応活性物質、DNA、RNA等の核酸関連物質、酵素、蛍光物質、放射性物質、発光物質等の標識関連物質等が挙げられる。

【0060】抗原、抗体等の免疫反応活性物質として

は、例えば、免疫グロブリン、血漿タンパク質、ホルモン関連物質、腫瘍関連物質、ウイルス関連物質、薬剤に対する抗体、酵素に対する抗体等が挙げられ、またこれらの物質に対する抗体も挙げられる。

【0061】血漿タンパク質としては、例えば、C反応性タンパク質(CRP)、アボタンパク質関連物質、リウマチ因子(RF)、トランスフェリン等が挙げられる。

【0062】ホルモン関連物質としては例えば、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、トリヨードサイロニン(T3)、サイロキシシン(T4)、チロキシシン結合タンパク質(TBG)等が挙げられる。

【0063】腫瘍関連物質としては、例えば、癌胎児性抗原(CEA)、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、 $\alpha$ フェトプロテイン(AFP)等が挙げられる。

【0064】ウイルス関連物質としては、例えば、HBs抗原、HBs抗体、HBe抗原、HBe抗体、ムンプス、ヘルペス、麻疹、風疹、抗エイズ抗体等が挙げられる。

【0065】薬剤に対する抗体としては、例えば、フェノバルビタール、アセトアミノフェノン、サリチル酸、シクロスポリン等の抗体が挙げられる。

【0066】酵素としては具体的には、例えば、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシターゼ、ペルオキシターゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシターゼ、リゾチーム等が挙げられる。

【0067】蛍光物質としては、例えば、フルオロセインイソチオシアネート、4-クロロ-7-ニトロベンゼンゾフラザン、4-フルオロ-7-ニトロベンゼンゾフラザン、スルホローダミン101酸クロライド等が挙げられる。

【0068】発光物質としては、例えば、10-メチル-9-[4-{2-(スクシニミジルオキシカルボニル)エチル}フェニルオキシカルボニル]アクリジニウムフルオロサルフェート等が挙げられる。

【0069】前記の生体関連物質のなかでも、免疫グロブリン、血漿タンパク質等がより好ましく挙げられる。

【0070】本発明のPC重合体により臨床検査用微粒子の分散安定性を向上させる方法としては、微粒子を含有する臨床検査試薬にPC重合体を0.001~1重量%となるように添加する方法である。

【0071】また、特に測定容器あるいはラインに対して吸着して凝集するような安定性の低い微粒子含有臨床検査試薬を使用する場合には、微粒子を含有する臨床検査試薬が測定容器あるいはラインに接触させる前に、前記の測定容器あるいはラインに対して、PC重合体を0.001~1重量%含む液を加えて、接触させる方法も有効である。

【0072】PC重合体が、0.001重量%より低い

濃度では微粒子分散安定化効果を十分に発揮させることができず、1重量%より高い濃度であるとPC重合体が粒子表面で必要以上に残留し免疫反応を阻害する恐れがあるため好ましくない。

【0073】本発明のPC重合体により臨床検査用微粒子の再分散性を向上させる方法としては、微粒子を凝集させる前の微粒子分散液にPC重合体を0.001~1重量%となるように添加する方法である。

【0074】本発明のPC重合体により臨床検査用微粒子の再分散性を向上させる別の方法としては、凝集させた微粒子を再分散させる直前にPC重合体を0.001~1重量%となるように添加する方法である。

【0075】PC重合体が、0.001重量%より低い濃度では微粒子再分散性を十分に発揮させることができず、PC重合体が1重量%より高い濃度であるとPC重合体が粒子表面で必要以上に残留し免疫反応を阻害する恐れがあるため好ましくない。

【0076】微粒子を再分散させる前の凝集させる方法としては、いずれの方法でもよいが、ポリスチレンラテックスのように媒体と比重のわずかに異なる微粒子の場合には遠心沈殿法が適当であり、磁性微粒子の場合には磁力により凝集させる方法が適当である。

【0077】本発明の微粒子含有臨床検査試薬は、前記の臨床検査用微粒子分散剤と検査用微粒子とを接触させて、前記の微粒子に担持させてなる微粒子を含有することを特徴とする微粒子含有臨床検査試薬である。特に臨床検査用微粒子には、例えば、前記に記載の抗原、抗体等の免疫反応活性物質、DNA、RNA等の核酸関連物質、酵素、蛍光物質、放射性物質、発光物質等の標識関連物質等あるいはこれらの関連物質の生物学的特異的な結合部位を担持したものが好ましく挙げられる。より好ましくは、抗原-抗体反応を用いる抗原（または抗体）を担持させたものが挙げられる。

【0078】本発明の臨床検査試薬の製造方法は、前記のように臨床検査用の水中分散微粒子と、前記に記載の臨床検査用微粒子分散剤水溶液とを接触させて、微粒子に前記の式(1)で表される単量体に基づく構成成分を含有する重合体を担持させた微粒子を作成する、容易な臨床検査試薬の製造方法である。

【0079】また、本発明の生体関連物質を分離精製する方法は、前記の臨床検査用微粒子分散剤と、生体関連物質に生化学的に特異的に結合する部位とを担持させた微粒子を用いる方法で、前記の微粒子と、さらに前記の生体関連物質とを接触させて複合体を形成させ、分離し、さらにその複合体から、前記の生体関連物質を分離して精製する方法である。微粒子が磁性微粒子の場合にも、生体関連物質としては、前記のものが使用でき、前記と同様な操作により、細胞、細菌、DNA、酵素等についても、それぞれに対して特異的な結合部位を有する物質を磁性微粒子に担持させて、同様に複合体の形成さ

せ、それを分離し、さらにその複合体から前記の生体関連物質を分離して精製する方法である。このような分離精製の場合には、前記と同様な理由から高い再分散性を有する磁性微粒子がより好ましく挙げられる。

【0080】本発明の臨床検査用微粒子分散剤には、本発明の効果を損なわない範囲において、界面活性剤、溶剤、防腐剤等の他の成分を添加してもよい。

【0081】

【発明の効果】第1の発明の臨床検査用微粒子分散剤は、臨床検査試薬を調整する過程及び検査に使用する過程において凝集させた検査用微粒子に対し、結合させている抗体や抗原等の活性を落とすことなく分散性を向上させ、さらに凝集状態からの再分散性を向上させる分散剤である。また、第2の発明の検査試薬は、前記の分散剤を用いて、担持させた臨床検査用微粒子を使用する再現性が高く高感度で自動分析機に適した検査試薬である。また、第3の発明の検査試薬の製造方法は、前記の分散剤を、微粒子に担持させた臨床検査用微粒子を使用する簡単な検査試薬の製造方法である。また、第4の発明の臨床検査方法は、前記の分散剤を用いて、担持させた臨床検査用微粒子を使用する臨床検査方法で容易に実施することができる。またさらに、第5の発明の生体関連物質の分離精製方法は、前記の分散剤を用いて、生体関連物質（例えば抗体（または抗原））を担持させた臨床検査用微粒子を使用するので容易に回収率よく生体関連物質の分離精製することができる方法である。

【0082】

【実施例】以下、実施例に基づいてさらに詳しく説明する。次に用いたポリマーの重量平均分子量の分析方法を示す。

<重量平均分子量の測定>リン酸バッファー(pH7.4、20mM)を溶離液としたゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)、ポリエチレングリコール標準、UV(210nm)及び屈折率を用いて検出した。

【0083】合成例1；ポリマー1(P-1)の合成  
MPC；35.7g、n-ブチルメタクリレート(BMA)；4.3g(単量体組成モル比、MPC/BMA=80/20)をエタノール；160gに溶解し4つ口フラスコに入れ、30分間窒素を吹込んだ後、60℃でアゾビスイソブチロニトリル；0.82gを加えて8時間重合反応させた。重合液を3リットルのジエチルエーテル中にかき混ぜながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48時間室温で真空乾燥を行って、粉末29.6gを得た。得られた共重合体は、GPCにより評価した重量平均分子量で153,000であった。これをポリマー1(P-1)とする。

【0084】合成例2；ポリマー2(P-2)の合成  
前記の合成例1のポリマー1に準じて単量体の種類、組成比(モル組成比MPC0.5-BMA0.2-MAc

0.3)、溶媒種を変え、合成例1と同様の操作により、重合体ポリマー2(P-2)を得た。得られた共重合体のポリマーは、前記と同様にして測定した結果、重

量平均分子量で354,000であった。

【0085】

【表1】

表1

		合 成 例	
		1	2
重合体記号		ポリマー1 P-1	ポリマー2 P-2
単 体 組 成	A成分	MPC 35.7g	MPC 73.1g
	B成分	BMA 4.8g	BMA 4.1g
	C成分		MAc 12.8g
モ ル 比	A/B、 A/B/C	A/B= 80/20	A/B/C= 50/20/30
溶 媒	種類 量	エタノール 160g	エタノール/ 水=4/6 400g
重量平均分子量		153,000	354,000

【0086】注；表中に用いた略号は次のとおりである。

MPC；2-（メタクリロイルオキシ）エチル-2'-（トリメチルアンモニオ）エチルホスフェート、

BMA；n-ブチルメタクリレート、

MAc；メタクリル酸

【0087】実施例1

平均粒径197nmのポリスチレン製ラテックス溶液（ジェイエスアル（株）社製）1.0mL（50mg/mL）に純水4mLを加え軽くかき混ぜた後、ポリマー1を0.01g加え（ポリマー1濃度0.2%）かき混ぜて溶解させた。その後、60000回転1時間で遠心分離し、上澄み液を捨て、ポリマー1を0.01g溶解させた純水5mLを加え超音波照射を行い再分散させた。この遠心分離操作をさらに4回繰り返して最終的にラテックス分散液5mLを得た。COULTER社製の

サブミクロン粒度分布計N4SD型を使用して、初期及び5回の遠心分離後のラテックスの粒径（D）、標準偏差（SD）およびCV値 $\{(SD/D) \times 100\}$ を求めた。結果を表2に示す。

【0088】比較例1

平均粒径197nmのポリスチレン製ラテックス溶液（ジェイエスアル（株）社製）1.0mL（50mg/mL）に純水4mLを加え軽くかき混ぜた。その後、60000回転1時間で遠心分離し、上澄み液を捨て、純水5mLを加え超音波照射を行い再分散させた。この遠心分離操作をさらに4回繰り返して最終的にラテックス分散液5mLを得た。そのラテックスを用いて、実施例1と同様にして数値を求めた。結果を表2に示す。

【0089】

【表2】

表2

		実施例	比較例
		1	1
微粒子		※ラテックス	※ラテックス
用いた重合体記号		P-1	-
濃 度 (重量%)		0.2	-
結 果	粒径 (D) (nm)	205	210
	標準偏差 (SD) (nm)	10.8	12.4
	CV値 $(SD/D) \times 100$ (%)	5.3	5.9

## 【0090】実施例2

平均粒径197 nmのポリスチレン製ラテックス溶液（ジェイエスアール（株）社製）1.0 mL（50 mg/mL）に20 mg/mLのヤギ抗（マウスIgG）抗体溶液1.0 mL（リン酸緩衝液）を添加して、室温にて2時間かき混ぜた。かき混ぜた後、20 mg/mLのウシ血清アルブミン溶液（リン酸緩衝液）を添加して、室温で2時間かき混ぜた。かき混ぜ終了後、ポリマー1を0.1%溶解させたリン酸緩衝液1.0 mLを加え軽く更にかき混ぜた。その後、40000回転、1時間の遠心分離を行った。遠心分離終了後、上清を除去した。その後、ポリマー1を0.1%溶解させたリン酸緩衝液3 mLを加え1分間の超音波照射で再分散させた。遠心分離による洗浄操作を4回繰り返して、最終的にポリマー1を0.1%溶解させたリン酸緩衝液を添加して、2 mg/mLのラテックス懸濁液を調製した。測定は自動分析機器7070（（株）日立製作所社製）で行った。

## &lt;試薬と条件&gt;

第1試薬（R1）；ポリマー1を0.1%溶解させたリン酸緩衝液200  $\mu$ L、

第3試薬（R3）；先に調製した2 mg/mLのラテックス懸濁液50  $\mu$ L、

検体；マウス血清（3種類の検体で同一検体を5回測定）3  $\mu$ L。

## &lt;条件&gt;

測定形式；2ポイントエンドの10分間反応、

キャリブレーション；スプライン、

測定ポイント；18-31、

測定波長は、700-340 nmである。結果を表3に示す。

## 【0091】実施例3

実施例2で用いたポリマー1の代わりにポリマー2を用いた以外は実施例2と同様に行った。結果を表3に示す。

## 【0092】比較例2

実施例2のポリマー1の代わりにウシ血清アルブミンを用いた以外は実施例2と同様に行った。結果を表3に示す。

## 【0093】

## 【表3】

表3

			実 施 例				比較例	
			2		3		2	
微粒子			*ラテックス		*ラテックス		*ラテックス	
用いた重合体記号			P-1 0.1%		P-2 0.1%		血清アルブミン	
測定結果			平均カント ±標準偏差 n=5	CV値	平均カント ±標準偏差 n=5	CV値	平均カント ±標準偏差 n=5	CV値
	検 体	1	25 ±1.1	4.4	22 ±0.8	3.6	14 ±2.8	20.0
		2	16 ±0.6	3.8	18 ±0.7	3.8	17 ±2.6	15.3
		3	42 ±1.5	3.6	45 ±1.4	3.1	40 ±9.8	24.5

## 【0094】実施例4

下記の（1-1）～（1-5）の操作手順で、ポリマー1を微粒子再分散剤として使用し抗体を結合させた磁性Fe微粒子分散液を作成し、抗原の測定を行った。

（1-1）粒径2.5  $\mu$ mのFe微粒子（ポリサイエンス社製、球状強磁性鉄粉）5.0 mgに $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン1.0 mLを加え、1分間の超音波照射で再分散させた後、室温で10分間インキュベートさせた。

（1-2）磁石で容器の底にFe微粒子を凝集させながら溶媒を除去し、磁力を解除した後、ポリマー1を0.1%溶解させたリン酸緩衝液1.0 mLを加え軽くかき混ぜて洗浄した。

（1-3）（1-2）の洗浄操作を2回繰り返した後、

2.5%グルタルアルデヒドのリン酸緩衝液5 mLを加え1分間の超音波照射で再分散させ、室温で1時間インキュベートを行った。

（1-4）（1-2）の操作を3回繰り返して余分なグルタルアルデヒドを取り除いた後、抗（マウスIgG）抗体の1.0 mg/mLのリン酸緩衝液1.0 mLを加え、室温で1時間インキュベートした。

（1-5）（1-2）の操作を3回繰り返した後、ポリマー1を0.1%溶解させたリン酸緩衝液1.0 mLを添加し、抗体固定化磁性Fe微粒子1 mL（磁性微粒子濃度；5 mg/mL）を得た。上の操作により得られた抗体固定化磁性Fe微粒子を使用して下記の（2-1）～（2-5）の手順で抗原の測定を行った。

（2-1）抗体固定化磁性Fe微粒子分散液100  $\mu$ L

づつを3本のガラス試験管(直径:12mm、長さ:75mm)に入れ、磁石で試験管の底に磁性Fe微粒子を凝集させ分散媒を取り除いた。

(2-2) 各容器に0ng/mL、10ng/mL、100ng/mLの3種類の濃度のマウスIgG溶液をそれぞれ500μLづつ加えて、1分間超音波をかけた後、室温で1時間インキュベートを行って抗原-抗体反応をさせた。

(2-3) 磁石で容器の底に前記のFe微粒子を凝集させながら溶媒を除去し、磁力を解除してポリマー1を0.1%溶解させたリン酸緩衝液1.0mLを加え軽くかき混ぜて洗浄した。

(2-4) (2-3)の洗浄操作を2回行った後、磁石で前記のFe微粒子を凝集させ分散媒を除去し、9-[(6,6-ジメチル-3-イソプロピル-2,4,5-トリオキサシクロヘキシノ)カルボニル]アントラセン標識抗(マウスIgG)抗体(以下、トリオキサン標識抗体と略す)溶液(濃度:330ng/mL)を500μL加えて室温で1時間インキュベートを行った。(なお、9-[(6,6-ジメチル-3-イソプロピル-2,4,5-トリオキサシクロヘキシノ)カルボニル]アントラセンは特開平6-228129号記載の

方法により合成し、N-ヒドロキシスクシンイミド及び、ジシクロヘキシルカルボジイミドを用いてアントラセン標識抗体を調製した。)

(2-5) (2-3)の洗浄操作を2回行った後、磁石で前記のFe微粒子を凝集させ分散媒を除去し、ジメチルホルムアミド200μL加え、10N水酸化ナトリウム液200μLをトリガーとして加え化学発光させた。発光量はLUMINESCENCE READER BLR-201(アロカ社製)を用いて、1分間までの積算発光カウントを測定した。測定結果を表4に示す。

#### 【0095】実施例5

実施例4のポリマー1を溶解させたリン酸緩衝液の代わりに、ポリマー2を溶解させたリン酸緩衝液を用いた以外は実施例4と同様に行い、1分間までの積算発光カウントを測定した。測定結果を表4に示す。

#### 【0096】比較例3

実施例4のポリマー1を溶解させたリン酸緩衝液の代わりに、ウシ血清アルブミンを添加したリン酸緩衝液を用いた以外は実施例4と同様に行い、1分間までの積算発光カウントを測定した。測定結果を表4に示す。

#### 【0097】

#### 【表4】

表4

			実 施 例				比較例	
			4		5		8	
微粒子			磁性F e微粒子		磁性F e微粒子		磁性F e微粒子	
用いた重合体 記号			P-1 0.1 %		P-2 0.1 %		血清アル ブミン	
測 定 結 果			平均値 ±標準偏差 n=5	CV値	平均値 ±標準偏差 n=5	CV値	平均値 ±標準偏差 n=5	CV値
	検 体	マウスIgG 濃度 ng/ml 0	22×10 <sup>3</sup> ±0.9×10 <sup>3</sup>	4.1	19×10 <sup>3</sup> ±0.7×10 <sup>3</sup>	3.6	20×10 <sup>3</sup> ±3.9×10 <sup>3</sup>	19.5
		10	32×10 <sup>3</sup> ±1.2×10 <sup>3</sup>	3.8	30×10 <sup>3</sup> ±1.4×10 <sup>3</sup>	4.7	28×10 <sup>3</sup> ±5.7×10 <sup>3</sup>	20.4
		100	45×10 <sup>3</sup> ±1.8×10 <sup>3</sup>	4.0	46×10 <sup>3</sup> ±1.8×10 <sup>3</sup>	3.9	42×10 <sup>3</sup> ±9.4×10 <sup>3</sup>	22.4

#### 【0098】実施例6

実施例4の(1-1)～(1-5)の操作手順で作成した抗体を担持させた磁性Fe微粒子を、100μLづつ3本の試験管(直径:12mm、長さ:75mm)に入れ、磁石で試験管の底に前記の磁性Fe微粒子を凝集させ分散媒を取り除いた。これにマウス血清500μLづつを加えて、1分間超音波をかけた後、室温で1時間インキュベートを行って、抗原-抗体反応をさせた。次いで、磁石で容器の底に前記のFe微粒子を凝集させながら溶媒を除去し、磁力を解除して、ポリマー1を0.1

%溶解させたリン酸緩衝液1.0mLを加えて軽くかき混ぜて洗浄した。この洗浄操作を2回行った後に、酢酸緩衝液(pH4.5)500μLを加えて1分間超音波をかけた後、室温で1時間インキュベートを行って結合した抗原(マウスIgG)を遊離させた。次いで、磁石で試験管の底に前記の磁性Fe微粒子を凝集させた後に、上清を400μL回収した。この上清に含まれるマウスIgG濃度を以下の方法で測定した。

<マウスIgGの測定>10μL/mgのヤギ抗(マウスIgG)抗体(和光純薬工業(株)社製)溶液(10

0mMリン酸緩衝液、pH7.5)をポリスチレン製96穴タイタープレート(イムノプレート、F96、マキシソープ、Nunc社製)に100 $\mu$ L/ウエルで加え、4℃、一晚インキュベートして物理的に吸着させた後に、生理的リン酸緩衝液(以下、PBSと略す)で4回洗浄を行った。次いで、5%のウシ血清アルブミン(以下、BSAと略す)を添加したPBSを300 $\mu$ L/ウエルで加え、4℃、一晚インキュベートした後に、BSA溶液を除去し、抗体吸着固相を調製した。次いで、先の上清をPBSで100倍希釈したものを100 $\mu$ L/ウエルで加え、25℃、2時間インキュベートし、続いてPBSで4回洗浄した。次いでパーオキシダーゼ標識-抗(マウス抗体)抗体(和光純薬工業(株)社製)溶液をPBSで10000倍希釈して、100 $\mu$ L/ウエルで加え、25℃、2時間インキュベートし、続いてPBSで4回洗浄した。次いで、ペルオキシダーゼ発色キットT(住友ベークライト(株)社製)で各ウ

表5

		実 施 例				比較例	
		6		7		4	
微粒子		磁性Fe微粒子		磁性Fe微粒子		磁性Fe微粒子	
用いた重合体 記号		P-1 0.1 %		P-2 0.1 %		血清アルブミン	
測定結果		平均値 ±標準偏差 n=8	CV値	平均値 ±標準偏差 n=8	CV値	平均値 ±標準偏差 n=8	CV値
	マウスIgG濃度 $\mu$ g/ml	92 ±3.8	4.1	89 ±3.1	3.4	54 ±6.2	11.5
回収率(%)		170		165		100	

【0102】なおここでは、回収率(%)は、比較例4を基準として実施例6および7で検出したマウスIgG量を%で表示した。

【0103】以上の結果より、比較例1～3に対して、

エルを室温で、10分間発色させた後に、SPECTRA MAX250(マイクロプレートリーダー、モレキュラーデバイス社製)を用いて、各ウエルの450nmの吸光度を測定した。既知量のIgGを含む溶液を用いて検量線を作成し、それを用いて先の上清中のマウスIgG濃度を求めた。1検体について8回測定した。結果を表5に示す。

#### 【0099】実施例7

実施例6で用いたポリマー1の代わりにポリマー2を用いた以外は、実施例6と同様に行い、マウスIgG濃度を求めた。結果を表5に示す。

#### 【0100】比較例4

実施例6で用いたポリマー1の代わりにウシ血清アルブミンを用いた以外は、実施例6と同様に行い、マウスIgG濃度を求めた。結果を表5に示す。

#### 【0101】

【表5】

実施例1～5の場合には、高い精度の結果が得られ、検査方法として優れていることがわかる。また、比較例4に比べて実施例6および7が回収率が高く、優れていることがわかる。